DIE EMPFINDLICHKEIT VON 80 STÄMMEN ANAEROBER GRAMNEGATIVER SPORENLOSER STÄBCHEN DER SPECIES BACTEROIDES FRAGILIS, B. THETAIOTAOMICRON UND B. VULGATUS GEGEN TETRACYCLIN, ROLITETRACYCLIN UND DOXYCYCLIN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt von

Bernd Spengruber

aus Velden an der Vils

Bonn 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523713_0028

DIE EMPFINDLICHKEIT VON 80 STÄMMEN ANAEROBER GRAMNEGATIVER SPORENLOSER STÄBCHEN DER SPECIES BACTEROIDES FRAGILIS, B. THETAIOTAOMICRON UND B. VULGATUS GEGEN TETRACYCLIN, ROLITETRACYCLIN UND DOXYCYCLIN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt von

Bernd Spengruber

aus Velden an der Vils

Bonn 1976

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Werner
2. Gutachter: Prof. Dr. K. O. Stumpe

Tag der mündlichen Prüfung: 29. März 1976

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie
der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. H. Brandis

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dissertationsdruck Ing. H.O. Hövelborn, 5216 Niederkassel-Mondorf, Provinzialstraße 25
Telefon Bonn 46 27 13

In Dankbarkeit

meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	7
Material und Methoden	13
A. Stämme	13
B. Prüfung der Empfindlichkeit gegen Tetracyclin, Rolitetracyclin und Doxycyclin	17
1. Reihenverdünnungsversuche	18
a. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	18
b. Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)	19
2. Agardiffusionstest	19
Ergebnisse	21
A. Wirksamkeit der 3 Tetracycline gegenüber 80 Bacteroides-Stämmen	24
1. Übersicht über die bei 80 Bacteroides-Stämmen ermittelten 3 MHK-Werte	24
a. Tetracyclin	24
b. Rolitetracyclin	25
c. Doxycyclin	26
2. Vergleichende Auswertung der 3 MHK-Werte	27
3. Vergleich zwischen Isolierungen aus 1973 / 74 und älterem Stamm-Material	28
a. Tetracyclin	28
b. Rolitetracyclin	28
c. Doxycyclin	28

Seite

B. Verhalten der 3 Bacteroides-Arten gegenüber den 3 geprüften Tetracyclinen 31

1. Empfindlichkeit der 56 Bacteroides fragilis-, 15 B. thetaiotaomicron- und 9 B. vulgatus-Stämme gegen Tetracyclin 31

2. Empfindlichkeit der 56 Bacteroides fragilis-, 15 B. thetaiotaomicron- und 9 B. vulgatus-Stämme gegen Rolitetracyclin 34

3. Empfindlichkeit der 56 Bacteroides fragilis-, 15 B. thetaiotaomicron- und 9 B. vulgatus-Stämme gegen Doxycyclin 37

Anhang 40

1. Bestimmung der Doxycyclin- und Rolitetracyclin-Empfindlichkeit nach längerer Bebrütungszeit 40

a. Doxycyclin 40
b. Rolitetracyclin 40

2. Relation zwischen Agardiffusionstest und MHK-Werten 42

Besprechung 44

Zusammenfassung 55

Literatur 57

EINLEITUNG

Die bakterielle Dickdarmflora besteht überwiegend aus anaeroben nichtsporenbildenden Keimen, unter denen beim mischkosternährten Menschen die gramnegativen anaeroben Stäbchen der Bacteroides-Gruppe vorherrschen (48, 54). Man gibt ihre Konzentration in den Faeces mit durchschnittlich 10^{10} oder mehr pro g Feuchtgewicht an (61). Bacteroides-Keime werden zunehmend als Erreger eitriger und septischer Infektionen beobachtet (21, 22, 41, 58, 59, 61).

Über die Differenzierung und Bedeutung der intestinalen Bacteroides-Arten herrscht auch in der neuesten Literatur noch keine Einigkeit. Manche der bis in die Gegenwart fortbestehenden Diskrepanzen sind historisch bedingt. Es wird sich daher auch im Zusammenhang mit der Antibiotika-Empfindlichkeit der intestinalen, eiter- und sepsiserregenden Bacteroides-Arten nicht umgehen lassen, auf die teilweise recht komplizierten Taxonomie- und Nomenklatur-Probleme etwas näher einzugehen.

EGGERTH und GAGNON (14) isolierten 1933 aus Stuhlproben 18 Bacteroides-Arten, von denen sie 16 neu beschrieben. Diese 18 Arten wurden von PRÉVOT 1938 (37) auf mehrere, meist von ihm auf Grund morphologischer Kriterien neu geschaffene Gattungen (Ristella, Sphaerophorus u.a.) verteilt. Eine Vereinfachung der Klassifikation bedeutete der Vorschlag von BEERENS et al. (4) aus dem Jahre 1962, isomorphe Ristella- bzw. Bacteroides-Arten von Fusobacterium- und Sphaerophorus-Stämmen durch ihr Verhalten gegenüber Threonin (Ristella bzw. Bacteroides negativ, Fusobacterium und Sphaerophorus positiv) abzugrenzen und die threoninnegative Gruppe nach dem Fermentationstyp, d.h. nach den bei der anaeroben Glukosevergärung gebildeten flüchtigen aliphatischen Säuren, zu differenzieren. Da BEERENS et al. (7) bei der Prüfung der Kohlenhydratspaltung bei der gleichen Bacteroides-Kultur zum Teil wechselnde Ergebnisse erzielten, hielten sie diese Merkmale für inkonstant und ließen 7 von EGGERTH und GAGNON (14) an Hand der Kohlenhydratspaltung differenzierte Arten in der Species Bacteroides convexus aufgehen. Diese eine alle

durch Rindergalle im Wachstum geförderten anaeroben gramnegativen sporenlosen Stäbchen enthaltende Species sollte zu der von BEERENS et al. (4) neu geschaffenen Gattung Eggerthella gehören. Eine grundsätzlich ähnliche Konzeption vertreten bis auf den heutigen Tag die meisten angloamerikanischen Bakteriologen, die intestinale und pyogene saccharolytische Bacteroides-Stämme summarisch als B. fragilis bezeichnen (1, 12, 16 - 19, 25 - 27, 31, 34, 36, 43 - 45, 64).

REINHOLD (38) grenzte 1964 bei 105 durch Rindergalle im Wachstum geförderten Bacteroides-Stämmen eine "Convexus-" und eine "Thetaiotaomicron-Gruppe" ab.

Im Jahre 1966 ordnete WERNER (48) 9 der von EGGERTH und GAGNON (14) beschriebenen Bacteroides-Arten in die von BEERENS und Mitarbeitern (4) geschaffene Gattung Eggerthella ein, und zwar die Species B. thetaiotaomicron, B. variabilis, B. uniformis, B. vulgatus, B. incommunis, B. distasonis, B. tumidus, B. convexus und B. exiguus. Im Gegensatz zu BEERENS et al. (7) sprach WERNER (48) sich für die Beibehaltung der von EGGERTH und GAGNON (14) beschriebenen Species aus, da die Kohlenhydratfermentation als konstantes Merkmal erkannt worden war (vgl. auch WERNER und RINTELEN (62)). Die Gruppe der intestinalen anaeroben gramnegativen sporenlosen Stäbchen sollte in Anlehnung an BEERENS und Mitarbeiter (4, 5, 7) Eggerthella genannt werden und bis zu 10 Species enthalten. Im Jahre 1969 kam WERNER (49) in einer vergleichenden Studie zu dem Schluß, daß Eggerthella convexa und Bacteroides fragilis identisch sind. Als weitere Synonyme von B. fragilis wurden später Sphaerophorus intermedius und Ristella pseudoinsolata nachgewiesen (Übersicht bei 54).

Das gegenwärtige Wissen um die Gruppe der intestinalen saccharolytischen Bacteroides-Arten kann nach den neuesten Darstellungen von WERNER und Mitarbeitern(58 - 63) etwa folgendermaßen zusammengefaßt werden:

Nach der Züchtung auf geeigneten Medien unter strikt anaeroben Bedingungen erscheinen intestinale saccharolytische Bacteroides-Kulturen mikroskopisch als gramnegative gerade bis leicht gebogene Stäbchen mit abgerundeten Enden, die einzeln

oder paarweise angeordnet sind. Nicht selten treten pleomorphe Zellen auf. Die verschiedenen Arten können morphologisch nicht voneinander differenziert werden und weisen auch gegenüber den nichtkohlenhydratfermentierenden Bacteroides-Arten (B.melaninogenicus, B. putredinis) und B. oralis lediglich geringgradige morphologische Unterschiede auf. Die Speciesdifferenzierung beruht daher in erster Linie auf biochemischen Merkmalen (54 - 56).

Wie andere Bacteroides-Arten häufen die kohlenhydratfermentierenden Species Isobuttersäure und Isovaleriansäure an (53, 60). Die verschiedenen saccharolytischen Bacteroides-Arten zeigen sehr ähnliche Pikrogramme (Essig-, Propion-, Isobutter-, Butter- und Isovaleriansäurebildung), unterscheiden sich jedoch von den asaccharolytischen oder schwach fermentierenden Arten (B. melaninogenicus, B. putredinis) durch das Fehlen von Butyratbildung und von B. oralis durch die Propionsäurebildung. Zur Erkennung der intestinalen saccharolytischen Bacteroides-Arten leistet auch der Glutaminsäuredecarboxylase-Test (51, 56) wertvolle Dienste. Eine positive Reaktion geben nämlich die saccharolytischen intestinalen Bacteroides-Arten (B. fragilis, B. thetaiotaomicron usw.). Dagegen setzt B. melaninogenicus aus Natrium-Glutaminat keine γ-Aminobuttersäure frei und unterscheidet sich insbesondere hierdurch von der ebenfalls asaccharolytischen Species B. putredinis.

Die saccharolytischen Bacteroides-Arten säuern Medien mit 1 % Glukose, Fruktose, Galaktose, Mannose, Laktose und Raffinose; eine Anzahl weiterer Kohlenhydrate wird in Abhängigkeit von der beteiligten Species fermentiert. B. fragilis z.B. reagiert xylose-positiv und arabinose-, rhamnose-, trehalose- und melecitose-negativ; Indol wird nicht gebildet. B. thetaiotaomicron dagegen fermentiert alle genannten Zucker und bildet Indol. B. vulgatus reagiert in den Pentosen positiv, spaltet jedoch Trehalose und Melecitose nicht und ist indolnegativ (54, 56, 62).

Diese Klassifizierung der intestinalen saccharolytischen Bacteroides-Gruppe erfährt durch das serologische Verhalten und die Phagen-Empfindlichkeit der Arten eine starke Stütze.

In Agglutinations- und Agargel-Diffusionsversuchen erwiesen sich die Angehörigen derselben Bacteroides-Species manchmal als antigenetisch verwandt, jedoch wurden bei Mitgliedern unterschiedlicher Species keine Kreuzreaktionen beobachtet (48, 50, 63).

NACESCU et al. (33) isolierten aus Abwasser zwei Bakteriophagen, die sich als streng spezifisch für B. fragilis-Stämme erwiesen. Angehörige der Species B. vulgatus, B. thetaiotaomicron, B. distasonis u.a. waren resistent. Mit Hilfe des Phagen φ A_1 wiesen die Autoren das Vorhandensein von B. fragilis in einer zuvor als B. thetaiotaomicron identifizierten (Misch-)Kultur nach. Zur praktischen Nutzbarmachung dieser offenbar hochempfindlichen Identifizierungsmethode bedarf es jedoch der Auffindung weiterer spezifischer Bakteriophagen (54).

Die Eigenständigkeit des B. fragilis und der anderen saccharolytischen Bacteroides-Arten belegte WERNER (55, 56) auch durch vergleichende Studien an Stämmen unterschiedlicher Herkunft. Durch Untersuchungen an 638 aus 33 Stuhlproben isolierten Bacteroides-Kulturen wurde gezeigt, daß die saccharolytische Bacteroides-Flora des menschlichen Darmes aus 7 - 10 oder mehr nahe verwandten Arten besteht (56). Nur zwei Arten, nämlich B. vulgatus und B. thetaiotaomicron, sind in der menschlichen Fäkalflora fast ständig nachweisbar, während andere Arten, einschließlich B. fragilis, offenbar nur unregelmäßig oder in verminderter Zahl auftreten (56). Dagegen wurden 133 von 165 aus pathologischem Material isolierten Bacteroides-Kulturen als B. fragilis identifiziert (55). Eine nennenswerte Häufigkeit wies hier nur noch B. thetaiotaomicron mit 28 Isolierungen auf. B. fragilis und B. thetaiotaomicron wurden, 65mal in Reinkultur bei eitrigen oder septikämischen Infektionen isoliert. Insgesamt nur viermal wurden B. vulgatus und B. distasonis isoliert, und zwar aus mischinfizierten Prozessen (u.a. perirektitische Abszesse), bei denen eine fäkale Kontamination wahrscheinlich war (56). Die pyogene Bacteroides-Gruppe wird demnach offensichtlich vorwiegend durch B. fragilis und B. thetaiotaomicron repräsentiert.

Aus dem unterschiedlichen Vorkommen der Arten in der normalen Dickdarmflora einerseits und in pathologischem Material andererseits zog WERNER (48,56) den Schluß, daß unter den intestinalen Bacteroides-Arten B. fragilis vergleichsweise große und B. vulgatus vergleichsweise geringe Virulenz für den Menschen besitzt.

Über die Virulenzmechanismen des B. fragilis ist wenig bekannt. Als möglicherweise pathogenetisch bedeutsam werden endotoxische Polysaccharide, die Kapsel, eine Neuraminidase sowie Fibrinolysin- und Hämolysin-Aktivitäten diskutiert (55,56).

B. fragilis besitzt eine besonders hohe natürliche Chemotherapeutika-Resistenz (siehe Tabelle 1); B. thetaiotaomicron verhält sich ähnlich. B. fragilis ist absolut resistent gegen Polymyxine und Aminoglycoside und weitgehend resistent gegen Penicilline und Cephalosporine (11,13). Wirksamkeit ist lediglich von Clindamycin (2,57) und Rifampicin (52) sowie in geringerem Maße von Chloramphenicol(7,11,13), Erythromycin (7,11,13) und Tetracyclinen (7,11,13) zu erwarten.

Tabelle 1
In vitro-Wirksamkeit von 13 Antibiotika auf B. fragilis und B. thetaiotaomicron (nach WERNER (56))

Antibiotikum	minimale Hemmkonzentration (µg/ml)
Penicillin G	10 - 50
Ampicillin	10 - 50
Carbenicillin	50 - 125
Cephaloridin	50 - 500
Cephalotin	50 - 500
Chlortetracyclin	0,2 - 1,0
Chloramphenicol	2,5 - 10
Erythromycin	2,5 - 10
Clindamycin	0,4 - 3,0
Rifampicin	0,005 - 0,2
Streptomycin	200 - 500
Neomycin	200 - 500
Colistin	200 - 500

Das immer häufigere Auftreten von B. fragilis und B. thetaiotaomicron bei Sepsis-Fällen ist möglicherweise auf die derzeit weitverbreitete Anwendung der Penicilline, Cephalosporine und Aminoglycoside, die in klinisch erreichbaren Spiegeln gegen diese Anaerobier größtenteils unwirksam sind, zurückzuführen (21,22,32,41).

In den letzten Jahren wurde von verschiedenen angloamerikanischen Autoren behauptet, daß B. fragilis und verwandte Keime zunehmend Resistenz gegen Tetracycline zeigten: NASTRO und FINEGOLD (34) fanden 1972 60 % tetracyclin-resistente Bacteroides-Stämme bei einer Wirkstoff-Konzentration von 12,5 µg/ml. (KISLAK (27) stellte im gleichen Jahr fest, daß mehr als die Hälfte von 40 als B. fragilis angesprochenen Kulturen minimale Hemmkonzentrationen von 12,5 µg/ml oder mehr aufwiesen. ZABRANSKY et al. (64) ermittelten an 50 B. fragilis-Stämmen minimale Hemmkonzentrationen von 0,25 - 128 µg/ml, wobei nur 40 % bei der im Blut erreichbaren Konzentrationen von 2,0 µg/ml erfaßt wurden.

Falls sich diese Beobachtungen weiterhin bestätigen, fielen Tetracycline aus der ohnehin schmalen Palette der bacteroideswirksamen Antibiotika aus. Die Klärung dieser Frage ist für die kurative Medizin von besonderem Interesse, weil infolge des für Erregerzüchtung und -identifizierung erforderlichen Zeitaufwandes die ätiologische Diagnose eitriger und septischer Bacteroides-Infektionen meist nicht früher als 3 - 4 Tage nach Eingang des Untersuchungsmaterials gestellt werden kann und die Ergebnisse von routinemäßigen Resistenzbestimmungen häufig noch später vorliegen. Aufgrund der "normalen" Chemotherapeutika-Empfindlichkeit der Erreger und aufgrund klinischer Bewährung galten bisher bekanntlich Tetracycline als Mittel der Wahl bei Bacteroides-Infektionen.

Es wurden daher Untersuchungen zur Ermittlung der gegenwärtigen Empfindlichkeit von B. fragilis und verwandten Arten gegen Tetracyclin, Rolitetracyclin und Doxycyclin eingeleitet. Zur Verfügung standen insgesamt 80 Kulturen, von denen allein 70 in den Jahren 1973 / 74 isoliert worden waren.

MATERIAL UND METHODEN

A. Stämme

Insgesamt wurden 80 Stämme strikt anaerober gramnegativer sporenloser Stäbchen der saccharolytischen Bacteroides-Arten B. fragilis, B. thetaiotaomicron und B. vulgatus untersucht.

Davon waren 70 Stämme Isolierungen aus den Jahren 1973/74 und 6 Kulturen Isolierungen aus den Jahren 1965 - 69; 3 Stämme wurden aus der National Collection of Type Cultures, London (NCTC 9343, NCTC 9344 und NCTC 8560 von B. fragilis) und ein weiterer aus der American Type Culture Collection (ATCC 8482 von B. vulgatus) bezogen.

Die 76 von 1965 - 74 isolierten Kulturen wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn, Labor Prof. Werner, identifiziert. Über die zwischen 1965 und 1969 isolierten Bacteroides-Stämme (3 B. fragilis, 2 B. thetaiotaomicron und 1 B. vulgatus) ist anderenorts berichtet worden (49,52). Die 70 Bacteroides-Stämme aus den Jahren 1973 / 74 wurden in den klinisch-bakteriologischen Laboratorien der folgenden 7 Institute bzw. Kliniken isoliert:

Anzahl der Stämme	Institut bzw. Klinik
39	Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität Erlangen-Nürnberg
22	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn
3	Stuyvenbergziekenhuis, Antwerpen
2	Zentrum für Innere Medizin der Universität Frankfurt / Main
2	Institut für Medizinische Mikrobiologie des Klinikums Essen der Ruhruniversität
1	Städtische Klinik für Lungenkranke Heckeshorn, Berlin
1	Staatliches Medizinal-Untersuchungsamt, Stade
70	

Das Untersuchungsmaterial aus den Jahren 1973 / 74 bestand aus 50 B. fragilis, 13 B. thetaiotaomicron- und 7 B. vulgatus-Kulturen.

Unter den insgesamt 76 nicht von ausländischen Kulturen-Sammlungen bezogenen Bacteroides-Stämmen herrschte demnach B. fragilis mit 53 Isolierungen eindeutig vor (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2
Differenzierung der 76 nicht aus Kulturensammlungen bezogenen Bacteroides-Stämme

Erreger-Species	Zahl der Isolierungen	davon in Reinkultur
B. fragilis	53	17
B. thetaiotaomicron	15	-
B. vulgatus	8	4
	76	21

Die 53 Isolierungen von B. fragilis verteilten sich auf 19 Krankheitsbilder (siehe Tabelle 3), von denen Appendicitis, eitrige Infektionen im Darmbereich, periproktitische Abszesse und Bauchdeckenabszesse im Vordergrund standen. In Reinkultur fand sich B. fragilis 17mal, dabei auffallend häufig bei Appendicitis. Über das Alter der Patienten gab es wenig Angaben. Das Geschlecht der Kranken war nur in 45 Fällen bekannt (25 ♀, 20 ♂).

Die 15 Kulturen von B. thetaiotaomicron wurden bei fünf Krankheitsbildern sowie in normaler Stuhlprobe und in einem Nasenabstrich, und zwar viermal in Reinkultur, nachgewiesen. Appendicitis und eitrige Infektionen im Darmbereich herrschten wiederum vor (siehe Tabelle 4). Das Lebensalter der Patienten war unbekannt. Das Geschlecht lag in 7 Fällen vor (4 weiblich).

B. vulgatus wurde, und zwar ausnahmslos in Mischkultur, aus eitrigen Prozessen (dreimal) sowie in normaler Stuhlprobe, Nasenabstrich und Ohrabstrich identifiziert (siehe Tabelle 5). Das Geschlecht war bei vier Kranken bekannt (2 ♀, 2 ♂).

Tabelle 3

Herkunft der 53 B. fragilis-Stämme

Pathologischer Prozess bzw. Untersuchungsmaterial	Zahl der Isolierungen	davon in Reinkultur
Hirnabszeß	1	-
Pleuraabszeß	1	-
eitrige Infektionen im Darmbereich	10	3
Appendicitis	6	5
Peritonitis	2	1
Bauchdeckenabszeß	3	1
Abszeß über LWK	1	-
Meningocele	1	-
periproktitischer Abszeß	4	-
Pyelitis	1	1
uterine Erkrankung	2	-
Vaginal-Abstrich	8	-
Douglasabszeß	1	1
Beinabszeß	2	2
Leukämie	1	1
Sperma	1	-
Furunkulose	1	-
Wunde	3	1
Phlegmone	1	1
ohne Angaben	3	-
	53	17

Tabelle 4

Herkunft der 15 B. thetaiotaomicron-Stämme

Pathologischer Prozeß bzw. Untersuchungsmaterial	Zahl der Isolierungen	davon in Reinkultur
Nasenabstrich	1	-
Cholangitis	1	1
Bauchdeckenabszeß	1	-
eitrige Infektionen im Darmbereich	5	-
Appendicitis	3	3
Punktat	1	-
normale Stuhlprobe	2	-
ohne Angaben	1	-
	15	4

Tabelle 5

Herkunft der 8 B. vulgatus-Stämme

Pathologischer Prozess bzw. Untersuchungsmaterial	Zahl der Isolierungen
Nasenabstrich	2
Ohrabstrich	1
eitrige Infektionen im Darmbereich	2
Perianalabszeß	1
normale Stuhlprobe	1
ohne Angaben	1
	8

B. Prüfung der Empfindlichkeit gegen Tetracyclin, Rolitetracyclin und Doxycyclin

Die Stämme der saccharolytischen Bacteroides-Arten wurden in Reihenverdünnungs- und Agardiffusionsversuchen auf Empfindlichkeit gegenüber Tetracyclin, Rolitetracyclin und Doxycyclin geprüft. Dabei wurden folgende Substanzen verwendet:

Chemische Bezeichnung	Handelsname	Hersteller	Op.-Nr. (Charge-Nr.)
Tetracyclin-HCl	Supramycin	Chemie Grünenthal	418
Doxycyclin	Vibramycin-HCl	Pfizer	-
Rolitetracyclin	Reverin	Hoechst	L 192

Aktivitätsgrad

Supramycin	1000 µg/mg
Vibramycin	860 µg/mg
Reverin	1000 µg/mg

Den genannten Herstellern ist der Verfasser für die Überlassung der Testsubstanzen zu Dank verpflichtet.

1. Reihenverdünnungsversuche

a. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Röhrchen mit 4,3 ml unmittelbar zuvor autoklavierter Thioglykolatbouillon (Difco) wurden mit jeweils 0,2 ml einer 20 - 24 Std. bei 37°C bebrüteten Rosenowbouillonkultur (3) des Teststammes beimpft. Danach wurden die Röhrchen mit jeweils 0,5 ml frisch in agarfreier Thioglykolatbouillon (Merck Art.Nr. 8190) in geometrischer Verdünnungsreihe hergestellter Antibiotikum-Lösung versetzt. Nach Durchmischen enthielten die Röhrchen jeder Versuchsreihe das jeweils geprüfte Tetracyclin in Konzentrationen von 200 µg/ml bis 0,00075 µg/ml. Die Röhrchen wurden mit sterilem Paraffin überschichtet und bei 37°C im Wärmeschrank bebrütet. In zwei Kontrollröhrchen mit jeweils 4,5 ml Thioglykolat-Bacteroides-Suspension (siehe oben) wurde 0,5 ml agarfreie Thioglykolatbouillon ohne Antibiotikum gegeben. Das eine Kontrollröhrchen wurde in den Kühlschrank, das andere in den Brutschrank bei 37°C gestellt.

In den Test- und Kontrollröhrchen betrug die initiale Keimdichte etwa 1 x 10^8/ml, wie kulturelle Keimzahlbestimmungen an zwei Bacteroides-Stämmen zeigten.

Hierzu wurden 20 - 24 Std. bei 37°C bebrütete Rosenowbouillonkulturen (3) der Stämme B. fragilis 8009/1 und B. thetaiotaomicron 1824/B in frisch ausgekochter Cystein-NaCl-Lösung (Cystein-HCl 0,03 %, NaCl 0,85 %) dezimal verdünnt bis 10^{-10}. Jeweils 0,1 ml der Verdünnungen wurden auf Hefeextract-Cystein-Glukose-Blutagarplatten ausgestrichen. Nach 3 Tagen Bebrütung bei 37°C in Brewer-Anaerostaten wurden die Kolonien ausgezählt. Bei der Keimzahlbestimmung wurden nur die Platten berücksichtigt, die Koloniezahlen zwischen 1 und 99 aufwiesen. Für die beiden Stämme B. fragilis 8009/1 bzw. B. thetaiotaomicron 1824/B wurden danach 2,4 x 10^9/ml bzw. 3,55 x 10^9/ml ermittelt. Da sich im Reihenverdünnungsversuch gemäß der oben beschriebenen Methode das Inokulum 1 : 25 verdünnt, betrüge die initiale Keimdichte bei den ermittelten Stämmen 0,96 x 10^8/ml bzw. 1,42 x 10^8/ml.

Da bereits nach fünf Stunden Bebrütung in den antibiotikum-freien Kontrollröhrchen aller 80 Teststämme deutliches bis ausreichendes Wachstum auftrat, erfolgte bereits zu diesem Zeit-

punkt die Ablesung. Als minimale Hemmkonzentration wurde dabei diejenige Tetracyclin-Konzentration bestimmt, die nach 5 Std. Bebrütungszeit gerade noch wachstumshemmend wirkte.

Anschließend wurden die dafür vorgesehenen Teströhrchen wieder in den Brutschrank gestellt und nach 3, 6 bzw. 10 Tagen erneute Ablesungen zur Bestimmung der "minimalen Hemmkonzentration" vorgenommen (siehe Teil "Ergebnisse, Anhang").

b. Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)

Zur Bestimmung der MBK-Werte wurden drei B. fragilis-Stämme, von denen einer aus der Sammlung stammte, und je ein B. thetaiotaomicron- bzw. B. vulgatus-Stamm gewählt.

Aus dem der MHK entsprechenden Teströhrchen, aus den folgenden unbewachsenen, eine höhere Antibiotikum-Konzentration aufweisenden Röhrchen und aus dem ersten bewachsenen Kulturröhrchen wurde jeweils eine Öse (≈ 0,01 ml) auf einer halben Hefeextrakt-Cystein-Glukose-Blutagarplatte ausgesät. Die Platten wurden in Brewer-Anaerostaten 3 bis 4 Tage bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt. Als minimale bakterizide Konzentration war diejenige Tetracyclin-Konzentration vorgesehen, bei der nach Ausimpfung von 0,01 ml Testbouillon weniger als 10 Kolonien anwuchsen (34).

2. Agar-Diffusionstest

Zwanzig Minuten auf 100°C erhitzte Rosenowbouillon (ohne Hirnstücke und $CaCO_3$), abgefüllt zu 2 ml in sterilen Zentrifugenröhrchen, wurde mit 0,1 ml einer 20 - 24 Std. bei 37°C bebrüteten Rosenowbouillonkultur beschickt und gut mit der Pipette gemischt. Diese Suspension wurde auf DST-Agarplatten (mit 7 % defibriniertem Menschenblut angereichertes DST-Agar-Grundsubstrat Oxoid) gegossen. Nach 5 Minuten Einwirkungszeit wurde das Überschüssige abpipettiert. Nach Antrocknen der Platten wurden die Testblättchen mit jeweils 20 µg des entsprechenden Te-

tracyclins aufgelegt. Die Platten wurden in Brewer-Anaerostaten 24 - 48 Std. bei 37°C bebrütet. Danach wurden die Durchmesser der Hemmhöfe abgemessen (in Anlehnung an 65).

ERGEBNISSE

Im folgenden werden in erster Linie die mit Hilfe von Reihenverdünnungsversuchen erhobenen Befunde dargestellt. Die Ergebnisse der Agardiffusionstests werden lediglich anhangsweise behandelt.

Die in Reihenverdünnungsversuchen mit 80 Bacteroides-Stämmen nach 5 Std. Bebrütung ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen der Tetracycline sind in Abbildung 1 (a - d) dargestellt. Aus Gründen der Vereinfachung wurde jede Kultur, entsprechend der Reihenfolge ihrer Prüfung, mit einer Arbeitsnummer belegt. Zur Species B. fragilis gehörten die Arbeitsnummern 1 - 42, 60, 61, 65 - 76, zur Species B. thetaiotaomicron die Arbeitsnummern 49 - 59, 62, 64, 79, 80 und zur Species B. vulgatus die Arbeitsnummern 43 - 48, 63, 77, 78.

Die Stämme mit den Arbeitsnummern 34, 38 und 46 wurden wegen zunächst bemerkenswert erscheinenden Ergebnissen wiederholt überprüft. Bei der Wiederholung fanden sich jedoch die gleichen MHK-Werte. Darüber hinaus wurden einzelne willkürlich herausgegriffene Kulturen nochmals getestet. Dabei stellten sich lediglich Abweichungen um $\pm$ 1 Röhrchen heraus.

Die Ergebnisse der Reihenverdünnungsversuche werden nachfolgend unter zwei Gesichtspunkten ausgewertet: Einmal soll die Wirkung der drei Tetracycline gegenüber dem gesamten Kulturen-Material und zum anderen das Verhalten der drei verschiedenen Bacteroides-Species deutlich gemacht werden.

Übersicht über die bei 80 Bacteroides-Stämmen nach 5 Std. - Bebrütung ermittelten MHK-Werte

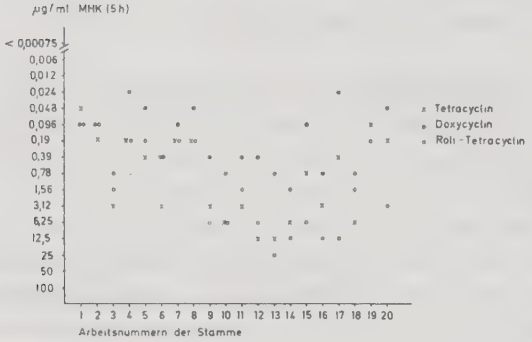

Abb. 1a

Übersicht über die bei 80 Bacteroides-Stämmen nach 5 Std. - Bebrütung ermittelten MHK-Werte

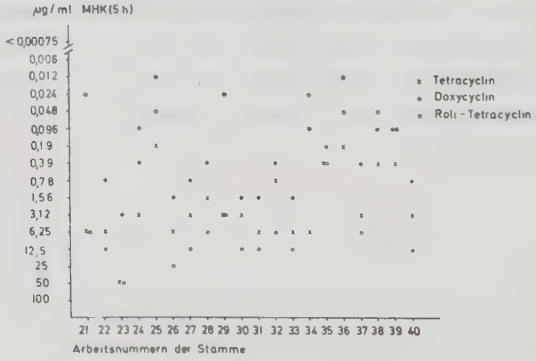

Abb. 1b

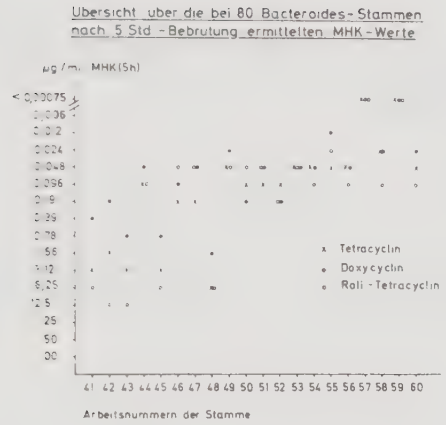
Übersicht über die bei 80 Bacteroides-Stämmen nach 5 Std. -Bebrutung ermittelten MHK-Werte
µg/ml MHK (5h)
< 0,00075
0,006
0,012
0,024
0,048
0,096
0,19
0,39
0,78
1,56
3,12
6,25
12,5
25
50
100
x Tetracyclin
• Doxycyclin
o Roli-Tetracyclin
41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
Arbeitsnummern der Stämme

Abb. 1c

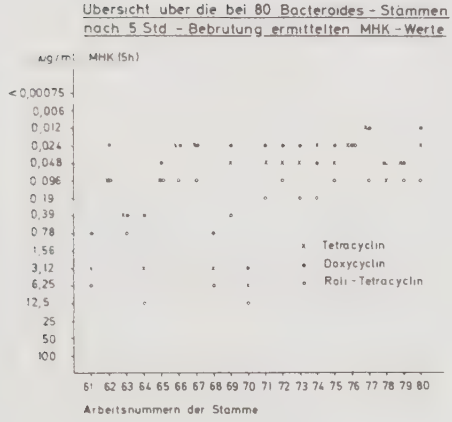
Übersicht über die bei 80 Bacteroides - Stämmen nach 5 Std. - Bebrutung ermittelten MHK - Werte
µg/ml MHK (5h)
< 0,00075
0,006
0,012
0,024
0,048
0,096
0,19
0,39
0,78
1,56
3,12
6,25
12,5
25
50
100
x Tetracyclin
• Doxycyclin
o Roli - Tetracyclin
61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
Arbeitsnummern der Stämme

Abb. 1d

A. Wirksamkeit der 3 Tetracycline gegenüber 80 Bacteroides-Stämmen

1. Übersicht über die bei 80 Bacteroides-Stämmen ermittelten 3 MHK-Werte

a. Tetracyclin

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, wurden 39 Bacteroides-Stämme durch sehr niedrige Tetracyclin-Konzentrationen (<0,00075-0,19 µg/ml) gehemmt; 38 weitere Kulturen zeigten MHK-Werte zwischen 0,39 und 6,25 µg/ml. Nur bei 3 Bacteroides-Stämmen lag der MHK-Wert über 6,25 µg/ml.

Tabelle 6
In vitro-Empfindlichkeit der 80 Bacteroides-Stämme gegen Tetracyclin

M H K (µg/ml)	Anzahl der Stämme
<0,00075	2
0,012	1
0,024	6
0,048	13
0,096	8
0,19	9
0,39	6
0,78	2
1,56	2
3,125	17
6,25	11
12,5	2
50,0	1
	80

b. Rolitetracyclin

Durch Rolitetracyclin-Konzentration von 0,19 µg/ml oder darunter wurden 41 Stämme gehemmt; 36 weitere Kulturen zeigten MHK-Werte zwischen 0,39 und 12,5 µg/ml (siehe Tabelle 7). Resistenz wurde bei 3 Stämmen festgestellt (MHK-Werte von 25 und 50 µg/ml).

Tabelle 7
In vitro-Empfindlichkeit der 80 Bacteroides-Stämme gegen Rolitetracyclin

M H K (µg/ml)	Anzahl der Stämme
< 0,00075	2
0,024	2
0,048	7
0,096	16
0,19	14
0,39	4
0,78	1
1,56	3
3,125	2
6,25	13
12,5	13
25,0	2
50,0	1
	80

c. Doxycyclin

Wie aus Tabelle 8 ersichtlich, zeigen saccharolytische intestinale Bacteroides-Stämme gegenüber Doxycyclin eine höhere Empfindlichkeit: 49 von 80 Kulturen wurden von Doxycyclin-Konzentrationen zwischen < 0,00075 und 0,19 µg/ml gehemmt, die restlichen Kulturen wurden durch 0,39 - 3,125 µg/ml Doxycyclin/ml erfaßt.

Tabelle 8
In vitro-Empfindlichkeit der 80 Bacteroides-Stämme gegen Doxycyclin

M H K (µg/ml)	Anzahl der Stämme
< 0,00075	2
0,012	6
0,024	16
0,048	13
0,096	8
0,19	4
0,39	11
0,78	12
1,56	6
3,125	2
	80

2. Vergleichende Auswertung der 3 MHK-Werte

In der Abbildung 2 ist die in vitro-Wirksamkeit der drei Tetracycline graphisch dargestellt. Auf der Abszisse wurden die minimalen Hemmkonzentrationen aufgetragen, die Ordinate gibt den kumulativen Prozentsatz empfindlicher Stämme an. Die Kurven von Tetracyclin und Rolitetracyclin weisen einen ähnlichen Verlauf auf. Bei 0,39 µg/ml bzw. 1,56 µg/ml wurde für beide Antibiotika der gleiche Prozentsatz empfindlicher Stämme (56,25 % bzw. 61,25 %) festgestellt, während bei der Konzentration von 1,56 ug/ml Doxycyclin bereits bei 97,5 % der Stämme wirksam war (siehe Abb. 2). Einen vergleichbaren Wirksamkeitsgrad von 98,75 % bzw. 96,25 % erreichten Tetracyclin und Rolitetracyclin bei der unter höchster Dosierung therapeutisch noch erreichbaren Konzentrationen von 12,5 µg/ml (siehe Abb. 2).

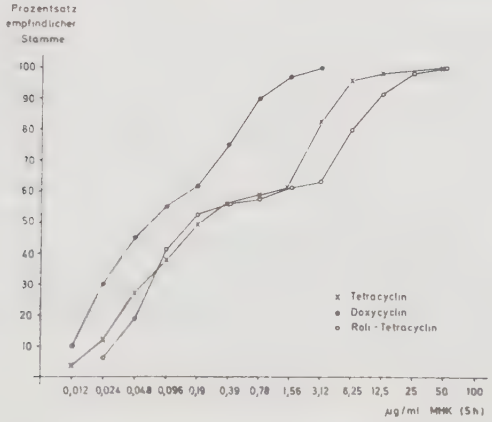

Abb. 2 Empfindlichkeit von 80 Bacteroides-Stämmen gegen Tetracyclin, Rolitetracyclin und Doxycyclin

3. Vergleich zwischen Isolierungen aus 1973 / 74 und älterem Stamm-Material

a. Tetracyclin

In Abbildung 3 ist die Tetracyclin-Empfindlichkeit der 1973 / 74 isolierten 70 Stämme und der teils 1965 - 69 isolierten, teils aus Kulturensammlungen bezogenen 10 Stämme getrennt graphisch dargestellt. 69 in den Jahren 1973 / 74 isolierte Kulturen wurden durch Tetracyclin-Konzentrationen zwischen $\ll$ 0,00075 und 12,5 µg/ml gehemmt, so daß insgesamt 98,6 % der Stämme durch die letztgenannte Konzentration erfaßt wurden. Nur eine Kultur zeigte Resistenz (MHK-Wert: 50,0 µg/ml). Die 10 vor 1970 isolierten Bacteroides-Stämme wiesen minimale Hemmkonzentrationen von 0,012 - 0,098 µg/ml auf und zeigten damit eine wesentlich größere Tetracyclin-Empfindlichkeit (siehe Abb. 3).

b. Rolitetracyclin

Die Rolitetracyclin-Empfindlichkeit der Stämme aus 1973/74 und der vor 1970 isolierten Kulturen ist in Abbildung 4 getrennt graphisch dargestellt. 67 in den Jahren 1973 / 74 isolierte Bacteroides-Stämme wiesen MHK-Werte von < 0,00075 - 12,5 µg/ml auf; demnach wurden 95,8 % der Stämme bei einer Rolitetracyclin-Konzentration von 12,5 µg/ml erfaßt. Bei den insgesamt 10 Kulturen aus den Jahren 1965 - 69 bzw. aus englischen und amerikanischen Sammlungen ergaben sich als Ausdruck größerer Rolitetracyclin-Empfindlichkeit minimale Hemmkonzentrationen von 0,048 - 0,19 µg/ml (siehe Abb. 4).

c. Doxycyclin

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich, wiesen die 70 Bacteroides-Vertreter aus den Jahren 1973 / 74 minimale Hemmkonzentrationen von $\leq$ 0,012 - 3,125 µg/ml auf. Demnach wurden 97,2 % der

Stämme bei einer Doxycyclin-Konzentration von 1,56 µg/ml gehemmt. Die 10 vor 1970 isolierten Bacteroides-Stämme wiesen mit minimalen Hemmkonzentrationen von 0,012 - 0,048 µg/ml eine insgesamt deutlich größere Doxycyclin-Empfindlichkeit auf (siehe Abb. 5).

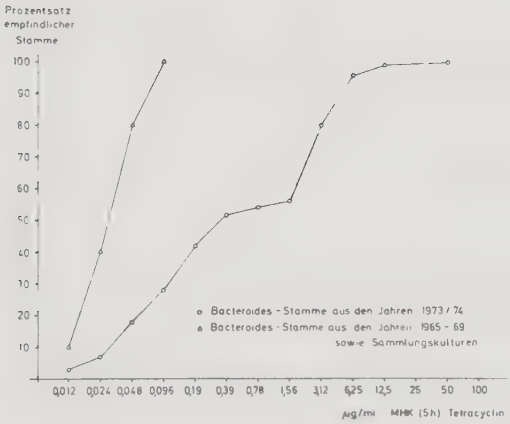

Abb. 3 Die Tetracyclin-Empfindlichkeit der 70 Isolierungen aus 1973/74 und des älteren Stamm-Materials

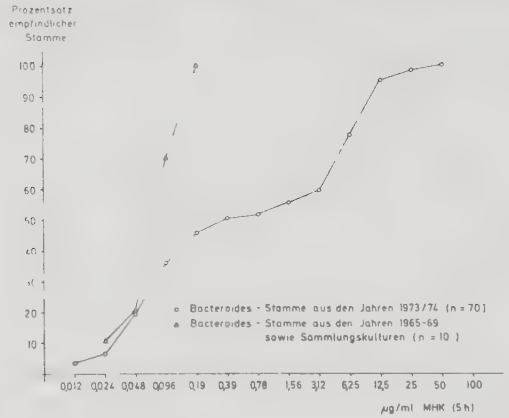

Abb. 4 Die Rolitetracyclin-Empfindlichkeit der Isolierungen aus 1973/74 und des älteren Stamm-Materials

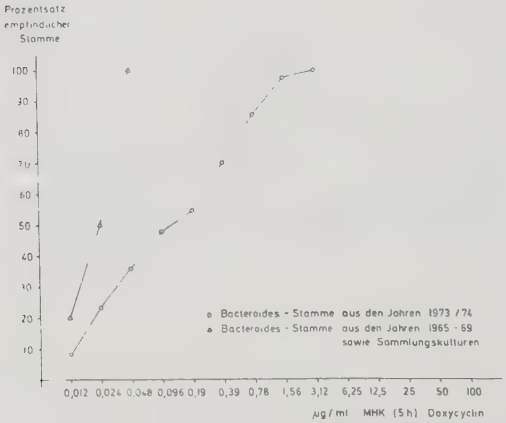

Abb. 5 Die Doxycyclin-Empfindlichkeit der Isolierungen aus 1973/74 und des älteren Stamm-Materials

B. Verhalten der 3 Bacteroides-Arten gegenüber den 3 geprüften Tetracyclinen

1. Empfindlichkeit der 56 Bacteroides fragilis-, 15 B. thetaiotaomicron- und 9 B. vulgatus-Stämme gegen Tetracyclin

Die minimalen Hemmkonzentrationen von Tetracyclin sind nach Bacteroides-Arten getrennt in Tabelle 9 aufgeführt.

Danach wurden 53 der 56 B. fragilis-Stämme durch Tetracyclin-Konzentrationen von 0,024 - 6,25 µg/ml gehemmt; drei weitere Kulturen waren resistenter und zeigten erst bei 12,5 bzw. 50,0 µg/ml Bakteriostase. Die mittlere MHK betrug 3,392 µg/ml.

Vierzehn von 15 B. thetaiotaomicron-Kulturen zeigten vergleichsweise niedrige MHK-Werte von < 0,00075 - 0,096 µg/ml (Tab. 9). Eine Kultur hatte eine MHK von 3,125 µg/ml. Die mittlere MHK lag bei 0,2957 µg/ml, womit sich diese Bacteroides-Art am empfindlichsten erwies.

Bei 5 von 9 B. vulgatus-Stämmen wurde eine MHK von 0,096 - 0,39 µg/ml festgestellt. Eine Kultur war wesentlich empfindlicher mit einem MHK-Wert von 0,012 µg/ml; drei Stämme waren resistenter mit den Werten 3,125 bzw. 6,25 µg/ml. Die mittlere MHK betrug 1,4974 µg/ml.

Eine Bestimmung der MBK erwies sich als unmöglich, da bei allen Stämmen selbst nach Aussaat aus den der 256-fachen MHK entsprechenden Röhrchen über 100 Bakterienkolonien wuchsen (vgl. "Material und Methoden").

Graphisch ist die unterschiedliche Tetracyclin-Empfindlichkeit der 3 Bacteroides-Arten in Abbildung 6 dargestellt. Entsprechend ihrer großen Empfindlichkeit liegt die Kurve der B. thetaiotaomicron-Stämme am weitesten nach links. B. vulgatus liegt in der Mitte und die den B. fragilis-Stämmen entsprechende Kurve am weitesten nach rechts.

Tabelle 9

In vitro-Empfindlichkeit der 3 Bacteroides-Species gegen Tetracyclin

Bacteroides-Species	MHK (µg/ml)	Anzahl der Stämme
B. fragilis	0,024	4
	0,048	7
	0,096	2
	0,19	7
	0,39	5
	0,78	2
	1,56	2
	3,125	14
	6,25	10
	12,5	2
	50,0	1
B. thetaiotaomicron	<0,00075	2
	0,024	2
	0,048	6
	0,096	4
	3,125	1
B. vulgatus	0,012	1
	0,096	2
	0,19	2
	0,39	1
	3,125	2
	6,25	1
		80

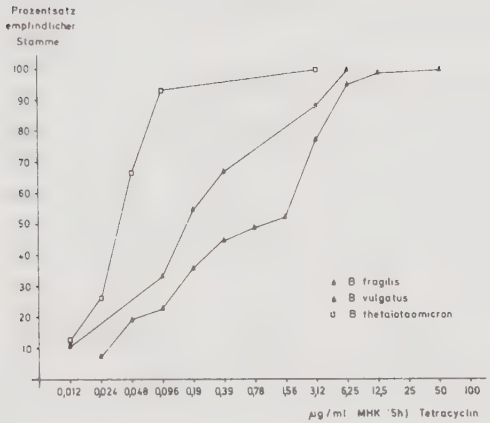

Abb. 6 Die Tetracyclin-Empfindlichkeit von B. fragilis, B. thetaiotaomicron und B. vulgatus

2. Empfindlichkeit der 56 Bacteroides fragilis-, 15 B. thetaiotaomicron- und 9 B. vulgatus-Stämme gegen Rolitetracyclin

Die MHK-Werte von Rolitetracyclin sind, nach Bacteroides-Arten getrennt, in Tabelle 10 zusammengestellt.

Danach wurden die 56 B. fragilis-Stämme durch Rolitetracyclin-Konzentrationen von 0,024 - 50,0 µg/ml gehemmt. 53 Stämme (95,4 %) wurden mit einer Antibiotikumkonzentration bis 12,5 µg/ml bakteriostatisch beeinflußt. Die mittlere MHK lag bei 5,733 µg/ml.

Am empfindlichsten reagierten wiederum die B. thetaiotaomicron-Stämme mit einer mittleren MHK von 1,037 µg/ml. 12 der 15 Kulturen hatten minimale Hemmkonzentrationen zwischen 0,024 und 0,19 µg/ml; ein Stamm erwies sich als vergleichsweise resistent mit einer MHK von 12,5 µg/ml. Zwei Stämme waren besonders empfindlich (MHK-Wert < 0,00075 µg/ml).

5 der 9 B. vulgatus-Kulturen hatten eine MHK von 0,048 - 0,096 µg/ml; 3 Vertreter dieser Bacteroides-Art wiesen wesentlich höhere MHK-Werte (6,25 bzw. 12,5 µg/ml) auf. Eine Kultur lag genau in der Mitte der Skala mit einem MHK-Wert von 0,78 µg/ml. Die mittlere MHK betrug 2,901 µg/ml.

Die Bestimmung der MBK erwies sich auch hier als unmöglich (mehr als 100 Bakterienkolonien nach Aussaat aus dem der 256-fachen MHK entsprechenden Röhrchen).

In der Abbildung 7 ist der kumulative Prozentsatz rolitetracyclin-empfindlicher Stämme nach den 3 Arten getrennt graphisch aufgezeichnet. Daraus wird deutlich, daß die B. fragilis-Vertreter vergleichsweise resistent sind (rechts liegende Kurve) und B. thetaiotaomicron sich als sehr empfindlich erweist. B. vulgatus liegt wiederum in der Mitte.

Tabelle 10

In vitro-Empfindlichkeit der 3 Bacteroides-Species gegen Rolitetracyclin

Bacteroides-Species	MHK (µg/ml)	Anzahl der Stämme
B. fragilis	0,024	2
	0,048	3
	0,096	10
	0,19	8
	0,39	3
	1,56	3
	3,125	2
	6,25	11
	12,5	11
	25,0	2
	50,0	1
B. thetaiotaomicron	< 0,00075	2
	0,024	1
	0,048	4
	0,096	6
	0,19	1
	12,5	1
B. vulgatus	0,048	3
	0,096	2
	0,78	1
	6,25	2
	12,5	1
		80

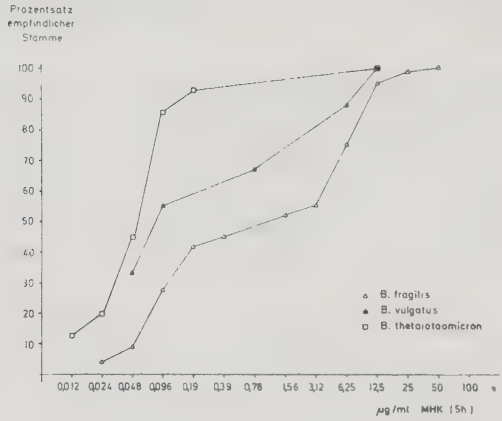

Abb. 7 Die Rolitetracyclin-Empfindlichkeit von B. fragilis, B. thetaiotaomicron und B. vulgatus

3. Empfindlichkeit der 56 Bacteroides fragilis-, 15 B. thetaiotaomicron- und 9 B. vulgatus-Stämme gegen Doxycyclin

Die bei den 3 Bacteroides-Arten mit Doxycyclin ermittelten MHK-Werte sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Doxycyclin-Konzentrationen von 0,012 - 3,125 µg/ml wirkten bei den 56 B. fragilis-Stämmen wachstumshemmend. Die mittlere MHK lag bei 0,482 µg/ml.

13 von 15 B. thetaiotaomicron-Stämmen hatten einen MHK-Bereich von 0,012 - 0,39 µg/ml, zwei Vertreter dieser Species hatten abermals einen MHK-Wert unter 0,00075 µg/ml. Die mittlere MHK wurde mit 0,0858 µg/ml bestimmt.

Bei 8 von 9 B. vulgatus-Kulturen wurde eine minimale Hemmkonzentration von 0,048 - 1,56 µg/ml festgestellt. Der neunte Stamm wurde schon durch eine Doxycyclin-Konzentration von 0,012 µg/ml gehemmt. Die mittlere MHK betrug 0,418 µg/ml.

Beim Versuch, die minimale bakterizide Konzentration bei 5 Bacteroides-Keimen zu bestimmen, stellte sich heraus, daß 4 Kulturen bei einer der 256-fachen MHK oder mehr entsprechenden Doxycyclin-Konzentration Kolonienzahlen von mehr als 100 aufwiesen. Ein B. fragilis-Stamm wies nach Aussaat des der 256-fachen MHK entsprechenden Röhrchens eine Kolonienzahl von 65 auf.

In Abbildung 8 wurde die unterschiedliche Doxycyclin-Empfindlichkeit der 3 Bacteroides-Species graphisch dargestellt. Die dem kumulativen Prozentsatz doxycyclin-empfindlicher Stämme entsprechenden Kurven von B. vulgatus und B. fragilis nehmen einen sehr ähnlichen Verlauf; bei beiden Arten werden ungefähr 88 % der Stämme durch eine Doxycyclin-Konzentration von 0,78 µg/ml gehemmt. Wesentlich empfindlicher reagiert B. thetaiotaomicron: 79,9 % der Stämme zeigen Bakteriostase bei einer Konzentration von 0,048 µg/ml und 100 % bei 0,39 µg/ml.

Tabelle 11

In vitro-Empfindlichkeit der 3 Bacteroides-Species gegen Doxycyclin

Bacteroides-Species	MHK (µg/ml)	Anzahl der Stämme
B. fragilis	0,012	3
	0,024	13
	0,048	5
	0,096	7
	0,19	2
	0,39	9
	0,78	10
	1,56	5
	3,125	2
B. thetaiotaomicron	<0,00075	2
	0,012	2
	0,024	3
	0,048	5
	0,19	2
	0,39	1
B. vulgatus	0,012	1
	0,048	3
	0,096	1
	0,39	1
	0,78	2
	1,56	1
		80

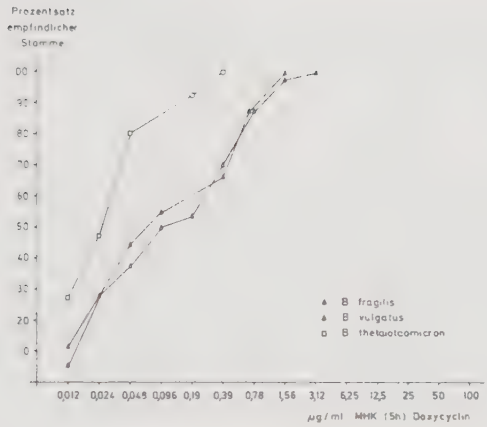

Abb. 8 Die Doxycyclin-Empfindlichkeit von B. fragilis, B. thetaiotaomicron und B. vulgatus

Anhang

1. Bestimmung der Doxycyclin- und Rolitetracyclin-Empfindlichkeit nach längerer Bebrütungszeit

a. Doxycyclin

Während nach 5 Stunden Bebrütungszeit 97,5 % der Stämme durch eine Doxycyclin-Konzentration von 1,56 µg/ml bakteriostatisch beeinflußt wurden, ergaben sich nach Bebrütungszeiten von 3, 6 und 10 Tagen deutlich abweichende MHK-Werte (siehe Abb. 9). Für das 3- bzw. 10-Tage-Ablesungs-Intervall standen 76 von 80 Stämmen bereit, nach 6 Tagen nur 57 von 80. Der Hauptunterschied zeigte sich bei den 5 Stunden- und 3 Tage-Werten. Nach 6 bzw. 10 Tagen Bebrütung traten nur noch geringgradige Änderungen auf (siehe Abb. 9).

b. Rolitetracyclin

Die Bestimmung der Rolitetracyclin-Empfindlichkeit war nach 3 und 10 Tagen bei 75 und nach 6 Tagen bei 66 von 80 Stämmen möglich (siehe Abb. 10). Wiederum trat zwischen den 5 Std.- und den 3 Tage-Werten ein Abstand von 4 bis 7 MHK-Stufen zutage (siehe Abb. 10). Zwischen dem 3. und 10. Tag blieb dagegen der kumulative Prozentsatz empfindlicher Stämme fast gleich.

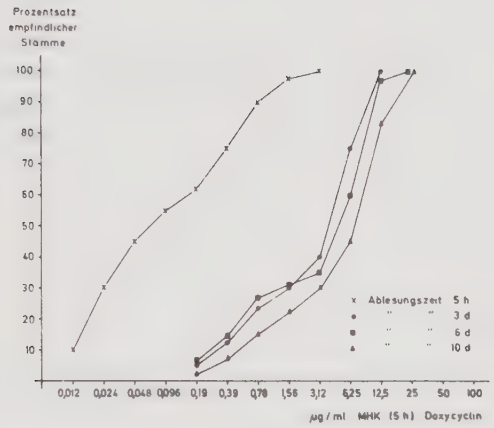

Abb. 9 Der Einfluß der Bebrütungszeit auf die Bestimmung der Doxycyclin-Empfindlichkeit

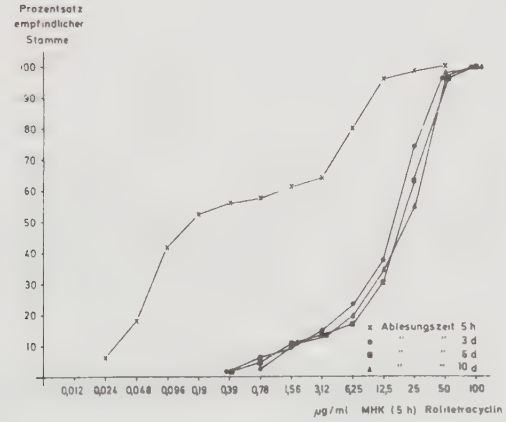

Abb. 10 Der Einfluß der Bebrütungszeit auf die Bestimmung der Rolitetracyclin-Empfindlichkeit

2. Relation zwischen Agardiffusionstest und MHK-Werten

Die ermittelten Hemmhofgrößen wurden in den Abbildungen 11, 12 und 13 in Relation zu den MHK-Werten gesetzt. Im halblogarithmischen Raster wurde (ohne statistische Berechnung) die Lage der Punktwolke durch eine Gerade veranschaulicht.

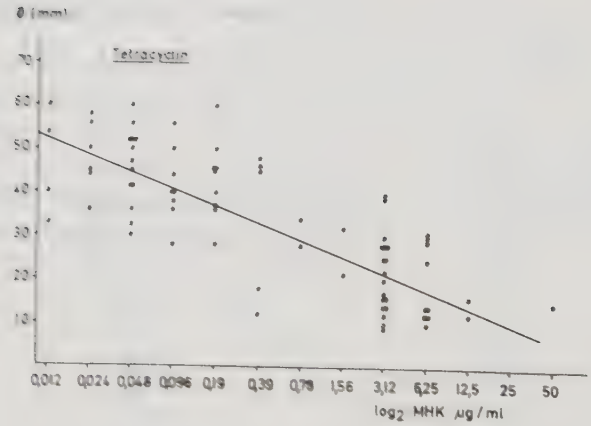

Abb. 11 Beziehung zwischen Hemmhofdurchmesser und MHK bei Tetracyclin

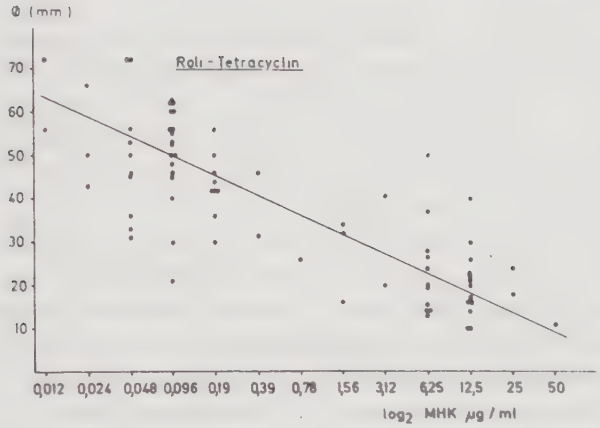

Abb. 12 Beziehung zwischen Hemmhofdurchmesser und MHK bei Rolitetracyclin

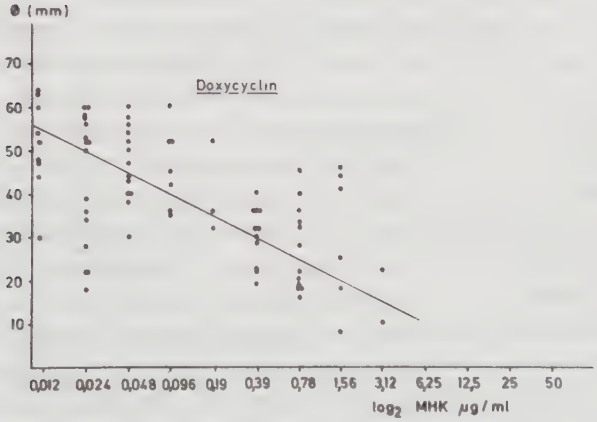

Abb. 13 Beziehung zwischen Hemmhofdurchmesser und MHK bei Doxycyclin

BESPRECHUNG

Die strikt anaeroben gramnegativen sporenlosen Stäbchen der saccharolytischen intestinalen Bacteroides-Gruppe rufen, teils allein, teils in Vergesellschaftung mit anderen Bakterien, eitrige Prozesse unterschiedlicher Lokalisation sowie Septikämie und Endocarditis hervor (2,8,10,15,19,21-23,28-30,32, 35,38,40,41,48,54-56,58,59,61).

Von einigen speziell interessierten europäischen Arbeitskreisen wurden diese Erreger in den letzten Jahren mit bemerkenswerter Häufigkeit in pathologischem Material gefunden. So trugen z.B. BEERENS und TAHON-CASTEL (8) sowie SCHAFFNER (40) aus dem Raum Lille, Frankreich, 81 Beobachtungen über Infektionen durch Eggerthella convexa (= Sammelbezeichnung für B. fragilis, B. thetaiotaomicron usw., siehe "Einleitung") zusammen. In 14 Fällen wurde "E. convexa" in Reinkultur nachgewiesen, und zwar je dreimal bei Sepsis und bei Abszessen verschiedener Lokalisation sowie je zweimal bei Hirnabszessen, Meningitis, Pleuritis und gynäkologischen Infektionen. REINHOLD (38) berichtete 1964 aus Halle a.d. Saale über 105 durch Rindergalle geförderte Stämme, die in den Jahren 1954 - 62 aus eitrigen Prozessen der Luftwege, des Darm- und Urogenitaltraktes des Menschen isoliert worden waren. 90 Stämme wiesen dabei eine weitgehende Übereinstimmung mit B. convexus (identisch mit B. fragilis, siehe "Einleitung") auf, 15 Stämme standen B. thetaiotaomicron nahe oder waren mit dieser Art identisch. WERNER (55) differenzierte in Bonn in den Jahren 1966 - 72 165 aus pathologischem Material gewonnene Stämme der saccharolytischen Bacteroides-Arten. Dabei war B. fragilis mit 133 Isolierungen (54mal in Reinkultur) am häufigsten und B. vulgatus mit 3 Isolierungen, davon alle in Mischkultur, am seltensten vertreten. Als B. thetaiotaomicron wurden 28 Stämme identifiziert; davon waren 11 in Reinkultur isoliert worden. Im Jahr 1973 war, u.a. infolge der Mitarbeit einiger auswärtiger Institute und Kliniken (vgl. "Material und Methoden"), eine beachtliche Zunahme der Isolierungen zu verzeichnen (WERNER, 55):

Bacteroides-Art	Anzahl der Isolierungen	davon in Reinkultur
B. fragilis	87	30
B. thetaiotaomiron	25	5
B. vulgatus	5	1
	117	36

B. fragilis und B. thetaiotaomicron waren als Erreger von Septikämie, Meningitis, Hirnabszessen, Otitis media, Lungenabszessen, Pleuraempyem, Leberabszessen, perityphlitischen und anderen intraabdominellen Abszessen, Wundinfektionen (vorwiegend nach Laparotomien), Pyometra, Pyosalpinx, Bartholinitis, Osteomyelitis, Eiterungen im Gesichtsbereich, Pyelitis u.a. nachweisbar (21,22,48,54-56,58,59). Die in der Darmflora vorherrschende Species B. vulgatus (siehe "Einleitung") erwies sich demgegenüber als pathogenetisch weniger bedeutsam (seltener Nachweis in so gut wie ausschließlich mischinfizierten, meist darmnahen, möglicherweise fäkal kontaminierten Prozessen).

Der Verlauf vieler eitriger und aller septischer Bacteroides-Infektionen hängt von der rechtzeitigen Einleitung einer wirksamen Chemotherapie ab. Befunde über die Chemotherapeutika-Empfindlichkeit von Bacteroides-Keimen wurden in etwa parallel mit dem Aufkommen der einzelnen Antibiotika erhoben. Bei dem nachfolgenden Überblick über die wichtigsten einschlägigen Arbeiten bleibt die taxonomische Einordnung mancher als Bacteroides angesprochener Anaerobier allerdings offen.

Bereits 1954 bezeichneten BEERENS und GUILLAUME (6) Eggerthella-Arten als Penicillin-resistent. STEVENS und HARRISON (42) sahen bei ihren Bacteroides-Isolierungen Resistenz gegen Penicillin und Streptomycin und Empfindlichkeit gegen Chloramphenicol und Chlortetracyclin. Nach FOLEY (20) wird B. fragilis von Streptomycin erst in Konzentrationen von über 750 µg/ml gehemmt. LOWELL-RANTZ (30) sowie LODENKÄMPER und STIENEN (28,29)

beobachteten bei Oxytetracyclin und Tetracyclin in vitro wie in vivo gute Wirksamkeit gegen Bacteroides-Arten. Da Neomycin gegen Bacteroides unwirksam ist, empfahlen 1954 FINEGOLD und HEWITT (17) die Substanz als Zusatz zu Selektivmedien zur Bacteroides-Züchtung. Nach FINEGOLD et al. (18,19) sind Bacteroides-Stämme vom Typ B. fragilis auch gegen Gentamycin und Polymyxin B resistent. Zur selektiven Anzüchtung der Bacteroides-Gruppe empfahlen die Autoren den Zusatz von 100 µg/ml Kanamycin und 7,5 µg/ml Vancomycin zu Selektivmedien. Von HOOGENDIJK (24) wurden 23 Stämme der B. fragilis-Gruppe gegen Ampicillin, Methicillin und Penicillin G sowie 13 Stämme derselben Species gegen Cloxacillin, Tetracyclin, Chloramphenicol und Erythromycin getestet. Gegen Penicillin G, Ampicillin, Methicillin und Cloxacillin wurde Resistenz festgestellt (24). BEERENS et al. (7) untersuchten vor 1963 58 Eggerthella-convexa-Stämme (in etwa identisch mit der B. fragilis-Gruppe) auf Rindfleisch-Leberextrakt-Blutagar mit den von BEERENS und Mitarbeitern (5) angegebenen Verfahren im Blättchentest gegen 11 gebräuchliche Antibiotika in den üblichen, den erreichbaren Blutspiegeln entsprechenden Konzentrationen. Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chloramphenicol waren stets, Oleandomycin bei 41, Erythromycin bei 28 Stämmen wirksam. Gegen Streptomycin, Neomycin, Kanamycin, Framycetin, Penicillin und Novobiocin bestand Resistenz. Über ähnliche Befunde an 50 Bacteroides-Stämmen mit Wuchsförderung durch Galle berichtete REINHOLD (39) 1965: Im Agardiffusionsversuch waren so gut wie alle Stämme empfindlich gegen Tetracyclin und Chloramphenicol. Sie waren ausnahmslos resistent gegen Penicillin, Streptomycin, die Antibiotika der Neomycin-Gruppe, Polymyxin B und Colistin.

KEUSCH und O'CONNELL (26) kamen auf Grund von Reihenverdünnungsversuchen zu dem Ergebnis, daß Penicillin und Ampicillin sowie in geringem Maße auch Cephalotin bei hoher Dosierung und parenteralen Applikation gegen Bacteroides-Stämme wirksam seien. Die Autoren hielten es für möglich, daß diese Antibiotika die Tetracycline vom ersten Platz in der Therapie der Bacteroides-Infektionen verdrängen könnten. PINKUS und Mitarbeiter

(36) wiesen dagegen bei Bacteroides-Stämmen Penicillinase-Aktivität nach. Nach ANDERSON und SYKES (1) sind B. fragilis-Stämme auf Grund einer intrazellulären β-Laktamase gegen Penicilline und Cephalosporine resistent. Übertragung der β-Laktamase-Aktivität von einem B. fragilis-Stamm auf einen anderen gelang nicht (1). Versuche, die Fähigkeit zur β-Laktamase-Bildung von B. fragilis auf Escherichia coli zu übertragen, blieben ebenfalls negativ (1). DEL BENE und FARRAR (12) stellten 1973 bei 10 B. fragilis-Stämmen ebenfalls Cephalosporinase-Aktivität fest. Diese B. fragilis-Cephalosporinase wurde durch Oxacillin inhibiert und zeigte die vergleichsweise größte Affinität gegenüber Cephaloridin. Cephalotin, Cephaloglycin und Cephalexin wurden - in dieser Reihenfolge - in geringerem Maße beeinflußt (12).

Clindamycin und in geringerem Maße Lincomycin sind gegen Keime der B. fragilis-Gruppe wirksam. BARLETT et al. (2) fanden im Reihenverdünnungstest 96% der Stämme gegen Clindamycin bei einer Konzentration von 3,1 µg/ml empfindlich; die meisten Kulturen waren auch sensibel gegenüber Lincomycin, allerdings war dieses Mittel weniger aktiv. WERNER und BÖHM (57) ermittelten bei 15 B. fragilis- und 9 B. thetaiotaomicron-Stämmen für Clindamycin MHK-Werte von 0,096 bis höchstens 3,12 µg/ml. Nach INGHAM et al. (25) sind die MHK-Werte von Erythromycin und Lincomycin um das 4- bis 32-fache erhöht, wenn die B. fragilis-Stämme in einer mit 10 % CO_2 angereicherten Wasserstoffatmosphäre bebrütet werden (Vergleichsstandard: reine Wasserstoffatmosphäre).

Die saccharolytischen intestinalen Bacteroides-Arten sind in vitro ausnahmslos rifampicin-empfindlich (INGHAM et al., 25, WERNER, 52). Während SCHOUTENS et al. (41) in vitro bei Sulfamethoxazol teilweise in niedriger Konzentration Wirksamkeit sahen, stellten VÖMEL und SAUER (46) bei dem Sulfanilamid-Derivat Glybencyclamid, einem oralen Antidiabetikum, praktisch keine antimikrobielle Wirkung gegen B. fragilis-, B. thetaiotaomicron- und B. vulgatus-Stämme fest.

In neuerer Zeit erschienen Berichte über zunehmende Te-

tracyclin-Resistenz bei B. fragilis und verwandten Keimen (10,15, 27,34,35,41,64). Sie waren Ausgangspunkt für die vorliegenden Untersuchungen über die Empfindlichkeit von 80 saccharolytischen intestinalen Bacteroides-Stämmen gegen Tetracyclin, Rolitetracyclin und Doxycyclin.

Tetracycline wirken in üblich erreichbaren Konzentrationen bakteriostatisch. Die Wirkung ist bei proliferierenden Keimen zuverlässiger als im Ruhestadium. Ein langsam bakterizider Effekt kann bei 30 - 60 (15 - 300)-facher Erhöhung der Hemmwerte in vitro bei proliferierenden Keimen beobachtet werden (47). Diese Resultate können jedoch nicht ohne Einschränkung auf in vivo-Verhältnisse übertragen werden, da der bakterizide Effekt bereits in vitro von zahlreichen Faktoren (Keimzahl, Einwirkungsdauer, Nährmedien, Serumzusatz u.a.) beeinflußt wird. Zur Beeinflussung von Keimen in Blutgerinnseln sind nochmals 10-fach höhere Konzentrationen erforderlich. In vivo können ausreichend hohe bakterizide Konzentrationen über genügend lange Zeit nicht erreicht werden (47).

Reihenverdünnungsversuche zum Nachweis der Chemotherapeutika-Empfindlichkeit anaerober Bakterien weisen einige methodische Besonderheiten auf. Hierzu ist in erster Linie die Tatsache zu rechnen, daß zur Züchtung gramnegativer sporenloser Anaerobier der Gattung Bacteroides in einfachen flüssigen Medien ein weitaus größeres Inokulum als bei Aerobiern notwendig ist (11,13). Die in der aeroben Bakteriologie geläufigen Dosis-Wirkungs-Relationen sind durch die 100 - 10.000-fache Vergrößerung des Inokulums völlig verschoben (13). Bei den vorliegenden Reihenverdünnungsversuchen wurde als initiale Keimdichte 1×10^8/ml (siehe "Material und Methoden") gewählt. Hierdurch wurde rasches Wachstum nach kurzer Bebrütungszeit gewährleistet, und die Ablesung konnte bereits nach 5 Stunden erfolgen.

Besondere Verhältnisse liegen darüber hinaus vor, wenn thermisch instabile Chemotherapeutika geprüft werden: Tetracyclin wird bei 37°C in wässriger Lösung bei pH 7 nach 10 Stunden zu 2 % und nach 24 Stunden zu 42 % inaktiviert (47). Dane-

ben ist der Einfluß des pH-Bereiches zu beachten, denn der Aktivitätsverlust von Tetracyclin beträgt nach 20-stündiger Bebrütung bei 37°C 65 % bei einem pH von 7,2. Das pH-Optimum von Tetracyclin liegt bei 6,1 (47). Dieser pH-Wert wurde daher bei der Lösung der drei Tetracycline eingehalten (siehe "Material und Methoden"). Eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch bestimmte Anteile der für Anaerostaten verwendeten Gasatmosphäre, wie sie INGHAM et al. (25) bei Untersuchungen zur Erythromycin- und Clindamycin-Empfindlichkeit von B. fragilis-Stämmen nachgewiesen haben, ist bei den vorliegenden Experimenten auszuschließen.

Unter Berücksichtigung der wichtigsten Fehlerquellen darf vermutet werden, daß die MHK-Bestimmung nach möglichst kurzer Bebrütungszeit vergleichsweise günstig ist und im übrigen den in vivo-Verhältnissen am nächsten kommt.

Nach einer Kurzzeitbebrütung von 5 Stunden wurde an 80 saccharolytischen intestinalen Bacteroides-Stämmen festgestellt, daß Tetracyclin und Rolitetracyclin ungefähr gleiche MHK-Werte aufwiesen: 61,25 % der Kulturen wurden durch Konzentrationen von 1,56 µg/ml und 98,75 % bzw. 96,25 % bei einer Konzentration von 12,5 µg/ml gehemmt (siehe Abb. 6, 7). Die letztgenannte Konzentration stellt den äußersten therapeutischen Bereich bei sehr hoher Tetracyclin- bzw. Rolitetracyclin-Dosierung dar (47). Bei Zugrundelegung der üblichen therapeutischen Blutspiegel von 2 bzw. 3 µg/ml (34,64) wären nach den vorliegenden in vitro-Ergebnissen 82 % der geprüften Stämme durch Tetracyclin und nur 64 % durch Rolitetracyclin zu beeinflussen (siehe Abb. 6, 7). Bei den eigenen Versuchen wurde allerdings die besonders hohe initiale Keimdichte von 1×10^8/ml verwendet. Unklar bleibt, ob in vivo ähnliche Bedingungen vorkommen können. Wahrscheinlich liegen im infizierten Makroorganismus, selbst bei Septikämie, sehr viel geringere Keimdichten vor, so daß von einer entsprechend geringeren Tetracyclin-Konzentration Wirkung erwartet werden darf. Die in vitro-Ergebnisse mit Doxycyclin - 97 % der Stämme gehemmt bei 1,56 µg/ml - sind noch günstiger (vgl. auch Abb. 8). ZABRANSKY et al. (64) sowie SUTTER et al. (45) stellten

ebenfalls eine gute in vitro-Empfindlichkeit von B. fragilis-Stämmen fest.

Ein Vergleich der einzelnen Bacteroides-Arten zeigte, daß Stämme der Species B. thetaiotaomicron am empfindlichsten auf die Tetracycline reagierten: 93,4 % der Kulturen wurden durch Konzentrationen von $\leq$ 0,19 µg/ml (Doxycyclin, Rolitetracyclin) bzw. $\leq$ 0,096 µg/ml (Tetracyclin) bakteriostatisch beeinflußt (siehe Abb. 6,7,8). B. vulgatus war weniger empfindlich, denn 8 der 9 geprüften Stämme wurden bei Konzentrationen von $\leq$ 3,125 µg/ml (Tetracyclin) bzw. $\leq$ 6,25 µg/ml (Rolitetracyclin) gehemmt. Als deutlich empfindlicher erwiesen sich die B. vulgatus-Stämme gegenüber Doxycyclin (8 von 9 Kulturen gehemmt bei $\leq$ 0,78 µg/ml; siehe Abb. 6,7,8). B. fragilis zeigte die geringste Empfindlichkeit; denn lediglich etwas mehr als die Hälfte der 56 Stämme wurde durch Rolitetracyclin-Konzentrationen von 3,125 µg/ml oder darunter beeinflußt (siehe Abb. 7). Bei Konzentration von 3,125 µg/ml oder darunter hemmte Tetracyclin dreiviertel der B. fragilis-Stämme, und wirkte Doxycyclin 100 %ig bakteriostatisch (siehe Abb. 6,8).

Bei einer vergleichenden Auswertung der Isolierungen aus den Jahren 1973 / 74 und des älteren Stamm-Materials erwiesen sich die 10 Stämme aus den Jahren 1965 - 69 sowie aus den Kulturensammlungen (siehe "Material und Methoden") als sehr empfindlich gegen die Tetracycline:Diese 10 Stämme wurden bereits bei Tetracyclin-Konzentrationen von 0,096 µg/ml oder darunter gehemmt. Durch Rolitetracyclin wurden bei gleicher Konzentration 7 von 10 Kulturen erfaßt. Schon bei einer halb so hohen Konzentration, nämlich 0,048 µg/ml, waren die 10 Stämme durch Doxycyclin gehemmt (siehe Abb. 3,4,5). Die Isolierungen der Jahre 1973 / 74 stellten sich demgegenüber als wesentlich resistenter heraus. Ihr Verhalten weicht nur wenig vom Gesamtbild ab (siehe "Ergebnisse" bzw. Abb. 3,4,5), das sie infolge ihrer vergleichsweise hohen Zahl im wesentlichen bestimmen.

Wie aus der neuesten Literatur über Tetracyclin-Empfindlichkeit von B. fragilis und verwandten Arten hervorgeht, wählten die meisten angloamerikanischen und belgischen Bakteriolo-

gen eine Bebrütung von 18 - 48 Stunden. Um den Einfluß der Bebrütungszeit auf den MHK-Wert zu bestimmen, wurden die meisten Rolitetracyclin- und Doxycyclin-Versuchsansätze nach der für die Beurteilung entscheidenden 5 Std.-Ablesung weiter bei 37°C bebrütet und nach 3, 6 und 10 Tagen erneut abgelesen. Dabei ergab sich, daß zwischen den 5 Std.-Werten und den Ergebnissen nach 3 Tagen meist 4 und mehr MHK-Stufen betragende Abweichungen bestanden (siehe Abb. 9,10). Dagegen traten nach 6 bzw. 10 Tagen Bebrütung nur noch geringgradige Unterschiede der Hemmwirkung auf.

Die zahlreichen Abweichungen zwischen Hemmhofgröße im anaeroben Agardiffusionstest und den MHK-Werten bei ein und demselben Stamm (vgl. Abb. 11 - 13) verdeutlichen die beträchtlichen Schwierigkeiten, die einer routinemäßigen Tetracyclin-Testung entgegenstehen. Bei orientierenden eigenen Versuchen zeigte sich z.B., daß nach Verminderung der Inokulum-Konzentration (siehe "Material und Methoden") auf 1 % in anaeroben Agardiffusionstests auf DST-Menschenblutagar kein Wachstum eintrat. Das Testergebnis wird außer durch initiale Keimsaat und thermische Inkonstanz des Chemotherapeutikums auch durch die Zusammensetzung der anaeroben Gasatmosphäre beeinflußt (25,43,44).

Unter Berücksichtigung der vielfach von Autor zu Autor unterschiedlichen Versuchsbedingungen (Reihenverdünnungstest bzw. anaerober Plattentest) fällt bei einem Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den Befunden angloamerikanischer und belgischer Verfasser auf (siehe Tab. 12), daß trotz der benützten hohen initialen Keimdichte von 1 x 10^8/ml der kumulative Prozentsatz empfindlicher Stämme bei den eigenen Untersuchungen höher liegt als bei anderen Autoren. Vor allem KISLAK (27) und MARTIN et al. (31) postulierten 1972 eine Tetracyclin-Resistenz der Bacteroides-Stämme, die sie als B. fragilis ansprachen. Nach KISLAK (27) sind nur 35 % der Teststämme auf Tetracyclin bei einer Konzentration von 1,56 ug/ml, die er als im Blut erreichbaren Spiegel bezeichnete, empfindlich; bei MARTIN et al. (31) ergab sich ein ähnlicher Wert mit 34 %iger Hemmung bei einer Konzentration von 1,6 µg/ml. Dagegen stellten 1973 SCHOUTENS

und Mitarbeiter (41) eine höhere Sensibilität des B. fragilis fest, nämlich Tetracyclin-MHK-Werte von 0,097 - 25,0 µg/ml. Dabei wurden 61 % der Stämme durch Tetracyclin-Konzentrationen von 1,56 µg/ml oder darunter gehemmt. SUTTER et al. (45) stellten bei 46 % ihrer Kulturen Bakteriostase bei Tetracyclin-Konzentrationen von 6,2 µg/ml oder darunter fest. Nach den eigenen Untersuchungen stellte sich bei 96 % der Isolierungen eine Hemmung bei einer Konzentration von $\leq$ 6,25 µg/ml ein. Einmal sollte wegen der thermischen Inkonstanz der Tetracycline eine möglichst kurze Bebrütungszeit angestrebt werden, zum anderen sollte durch die 5 Std.-Ablesung sozusagen eine Annäherung an die Verhältnisse im infizierten Makroorganismus erreicht werden. Zur Realisierung der Kurzzeitablesung war die vergleichsweise sehr hohe initiale Keimzahl von $\approx 10^8$/ml nötig; andere Autoren (vgl. z.B. 64) arbeiteten meist mit 10^6/ml. Wenn man - wie in der aeroben Bakteriologie üblich - unterstellt, daß die Erhöhung der initialen Keimdichte um eine Zehnerpotenz die MHK-Werte um mindestens eine Stufe verschiebt, wären die eigenen Ergebnisse interpretatorisch sozusagen noch mit dem Faktor 1 : 4 zu versehen.

Von KISLAK (27) wurde 1972 angegeben, daß Doxycyclin nur 37 % der untersuchten B. fragilis-Stämme bei Konzentrationen von 1,56 µg/ml oder darunter hemmte. SUTTER et al. (45) fanden bei $\leq$ 3,1 µg/ml Wirkung auf 63 % der Kulturen. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurden 97 % der saccharolytischen intestinalen Bacteroides-Stämme bei Doxycyclin-Konzentrationen nicht über 1,56 µg/ml bakteriostatisch beeinflußt. Aufgrund des oben diskutierten Einflusses der hohen initialen Keimzahl von 10^8/ml könnte man dieses Ergebnis um vielleicht 2 MHK-Stufen erniedrigt werten, so daß die eigenen Doxycyclin-Befunde weitgehend denen von SCHOUTENS et al. (41; siehe auch Tab. 12) entsprechen dürften.

Die vorgelegten Untersuchungen haben demnach gezeigt, daß auch gegenwärtig 96 - 100 % der saccharolytischen intestinalen Bacteroides-Stämme gegen Tetracyclin, Rolitetracyclin und Doxycyclin in therapeutisch erreichbaren Konzentrationen empfind-

lich sind. Bei Verdacht auf Bacteroides-Septikämie oder bei anderen behandlungsbedürftigen Infektionen durch diese natürlicherweise hochresistente Keimgruppe können daher Antibiotika der Tetracyclin-Gruppe weiterhin als Mittel der Wahl gelten.

Tabelle 12

Vergleich der Angaben verschiedener Autoren über die Tetracyclin-Empfindlichkeit der B. [illegible] Gruppe

Anzahl der geprüften Stämme	Bebrütungszeit	kumulativer Prozentsatz empfindlicher Stämme und Antibiotikum	Autoren und Berichtsjahr
19	48 h	55 % bei 1,56 µg/ml (Tetracyclin)	NASTRO und FINEGOLD (1972)
40	18 h	35 % bei 1,56 µg/ml (Tetracyclin)	KISLAK (1972)
		37 % bei 1,56 µg/ml (Doxycyclin)	
195	48 h	34 % bei 1,6 µg/ml (Tetracyclin)	MARTIN et al. (1972)
50	48 h	40 % bei 2,0 µg/ml (Tetracyclin)	ZABRANSKY et al. (1973)
27	48 h	61 % bei 1,56 µg/ml (Tetracyclin)	SCHOUTENS et al. (1973)
		100 % bei 0,39 µg/ml (Doxycyclin)	
63	48 h	46 % bei 6,2 µg/ml (Tetracyclin)	SUTTER et al. (1973)
		63 % bei 3,1 µg/ml (Doxycyclin)	
80	5 h	96 % bei 6,25 µg/ml (Tetracyclin)	eigene Untersuchungen
		97 % bei 1,56 µg/ml (Doxycyclin)	

Zusammenfassung

Ausgehend von neueren Berichten über zunehmende Tetracyclin-Resistenz bei Bacteroides fragilis und verwandten Arten, wurde die in vitro-Empfindlichkeit von 80 Bacteroides-Stämmen, zu denen 70 Isolierungen aus den Jahren 1973 / 74 gehörten, gegen Tetracyclin, Rolitetracyclin und Doxycyclin in Reihenverdünnungsversuchen überprüft.

Mit Hilfe einer hohen initialen Keimdichte konnte die üblicherweise 2 Tage und mehr betragende Bebrütungszeit auf 5 Stunden reduziert und die Beeinflussung der Resultate durch thermische Inaktivierung der Tetracyclin-Präparate gering gehalten werden.

In Konzentrationen von < 0,00075 bis 12,5 µg/ml wirkte Tetracyclin bei 79 Stämmen wachstumshemmend. Die MHK einer B. fragilis-Kultur betrug sogar 50 µg Tetracyclin/ml.

Durch Rolitetracyclin wurden 77 Stämme in Konzentrationen von < 0,00075 bis 12,5 µg/ml gehemmt. Zur bakteriostatischen Beeinflussung von 2 weiteren Kulturen waren 25 µg/ml nötig; die MHK eines B. fragilis-Stammes lag bei 50 µg/ml.

Gegen Doxycyclin zeigten die Teststämme MHK-Werte von < 0,00075 bis 3,12 µg/ml. Bei einer Doxycyclin-Konzentration von 1,56 µg/ml waren bereits 97,5 % der Stämme erfaßt. Lediglich 2 Kulturen wiesen eine MHK von 3,12 µg Doxycyclin/ml auf.

Während anglo-amerikanische Bakteriologen die saccharolytischen intestinalen Bacteroides-Arten meist summarisch als B. fragilis-Gruppe ansprechen, wurde das vorliegende Kulturen-Material in Spezies differenziert. Beim Vergleich der 3 Bacteroides-Arten zeigte sich, daß B. thetaiotaomicron-Stämme am empfindlichsten auf Tetracyclin, Rolitetracyclin und Doxycyclin reagierten. Die bekanntlich pathogenetisch weniger bedeutsamen B. vulgatus-Stämme besaßen eine geringere Empfindlichkeit als die Angehörigen von B. thetaiotaomicron. B. fragilis zeigte die geringste Empfindlichkeit. Zu dieser Spezies gehörten die Kulturen mit den besonders hohen MHK-Werten.

Bei einer vergleichenden Auswertung der Isolierungen aus

den Jahren 1973 / 74 und des älteren Stamm-Materials erwiesen sich die 10 in den Jahren 1965 - 69 isolierten bzw. aus Kulturensammlungen bezogenen Stämme als sehr empfindlich. Diese 10 Kulturen wurden bereits durch Tetracyclin-Konzentrationen von 0,096 µg/ml oder darunter bzw. durch $\leq$ 0,19 µg/ml Rolitetracyclin gehemmt. Schon in halb so hoher Konzentration, nämlich 0,048 µg/ml, war Doxycyclin bei allen 10 Stämmen wirksam. Die Isolierungen aus den Jahren 1973 / 74 waren demgegenüber wesentlich resistenter; ihr Verhalten wich nur wenig vom Gesamtbild ab, das sie infolge ihrer hohen Zahl in erster Linie bestimmten.

Bei Berücksichtigung der ungewöhnlich hohen Ausgangskeimdichte von $\approx 10^8$/ml und Umrechnung auf das übliche Inokulum von 10^6/ml könnten die erzielten Resultate noch mit dem Faktor 1 : 4 versehen werden. Danach wären 79 Bacteroides-Stämme (98,75 %) als tetracyclin- und rolitetracyclin-empfindlich und 80 Kulturen als doxycyclin-sensibel einzustufen.

Trotz eines merklichen Rückganges der Tetracyclin-Empfindlichkeit können daher bei Verdacht auf Bacteroides-Septikämie oder bei anderen chemotherapeutisch behandlungsbedürftigen Infektionen durch diese natürlicherweise hochresistente Keimgruppe Antibiotika der Tetracyclin-Gruppe weiterhin eingesetzt werden.

LITERATUR

1. ANDERSON, J.D., SYKES, R.B.: Characterisation of a β -lactamase obtained from a strain of Bacteroides fragilis resistant to β-lactam-antibiotics. J. med. Microbiol. 6, 201-206 (1973)
2. BARTLETT,J.G., SUTTER, V.L., FINEGOLD, S.M.: Treatment of anaerobic infections with lincomycin and clindamycin. New Engl. J. Med. 287, 1006-1010 (1972)
3. BEERENS, H.: Les bactéries anaérobies. In: Manuel de techniques bactériologiques, von R. Buttiaux, H. Beerens, A. Tacquet. Paris: Flammarion 1962
4. BEERENS, H., CASTEL, M.M., FIEVEZ, L.: Classification des Bacteroidaceae. Abstract VIIIth Internat. Congress for Microbiology, Montreal p. 120, 1962
5. BEERENS, H., CASTEL, M.M., MODJADEDY, A.: Recherches sur la détermination de la sensibilité des bactéries anaérobies non sporulés à onze antibiotiques par la methode des disques. Résultats obtenus avec 180 souches. Ann. Inst. Pasteur Lille 13, 106 (1962)
6. BEERENS, H., GUILLAUME, J.: Technique de détermination de la sensibilité des bactéries anaérobies aux antibiotiques par la methode des disques. Ann. Inst. Pasteur 86,781-785 (1954)
7. BEERENS, H., SCHAFFNER, Y., CASTELL, M.M., GUILLAUME, J.: Les bacilles anaérobies non sporulés à Gram négatif favorisés par la bile. Leur appartenance au genre Egg. (nov. gen.). Ann. Inst. Pasteur Lille 14, 5-48(1963)
8. BEERENS, H., TAHON-CASTEL, M.: Infections humaines à bactéries anaérobies non toxigènes. Presses Académiques Européennes, Brüssel 1965
9. BEERENS, H., WATTRE, P., SHINJO, T., ROMOND, C.: Premiers résultats d'un essai de classification sérologique de 131 souches de Bacteroides du groupe fragilis (Eggerthella). Ann. Inst. Pasteur 121, 187-198 (1971)
10. BODNER, S.J., KÖNIG, M.G., GOODMAN , J.S.: Bacteremic Bacteroides infections. Ann. Int. Med. 73, 537-544 (1970)
11. BOLL, G.: Reihenverdünnungsversuche zum Nachweis der Antibiotikaempfindlichkeit von Bacteroides (Eggerthella)-Arten. Inaug.-Diss., Bonn 1969
12. Del BENE, V.E., FARRAR, W.E.Jr.: Cephalosporinase activity in Bacteroides fragilis. Antimicrob. Agents Chemother. 3, 369-372 (1973)
13. EDELMANN, M.: Untersuchungen über die Antibiotikaempfindlichkeit von Bacteroides-, Fusobacterium- und Sphaerophorus-Arten, Inaug.-Diss., Bonn 1973
14. EGGERTH, A.H., GAGNON, B.H.: The Bacteroides of human feces. J. Bact. 25, 389-413 (1933)
15. FELNER, J.M., DOWELL, V.R.Jr.: Bacteroides bacteremia. Amer. J. Med. 50, 787-796 (1971)

16. FINEGOLD, S.M., HARADA, N.E., MILLER, L.G.: Lincomycin: activity against anaerobes and effect on normal human fecal flora. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 659-667 (1965)
17. FINEGOLD, S.M., HEWITT, W.L.: Antibiotic sensitivity pattern of Bacteroides species. Antibiotics Annual, 794 (1955/56)
18. FINEGOLD, S.M., MILLER, A.B., POSNICK, D.J.: Further studies on selective media for Bacteroides and other anaerobes. Ernährungsforschung 10, 517-528 (1965)
19. FINEGOLD, S.M., SUTTER, V.L.: Susceptibility of gram-negative anaerobic bacilli to gentamicin and other aminoglycosides. J. infect. Dis. 124/Suppl. 56-58 (1971)
20. FOLEY, G.E.: In vitro resistance of the genus Bacteroides to streptomycin. Science (Baltimore) 106, 423 (1947)
21. HAESELER, K.: Septische und eitrige Infektionen durch Bacteroides fragilis. Inaug.-Diss., Bonn 1974
22. HAGHGU, M.B.: Darmnahe Eiterungsprozesse durch Bacteroides fragilis. Inaug.-Diss., Bonn 1973
23. HOFMANN, K., GIERHAKE, F.W.: Postoperative Wundinfektionen durch Anaerobier. Dtsch. med. Wschr. 93, 1888-1890 (1968)
24. HOOGENDIJK, J.L.: Resistance of some strains of Bacteroides to ampicillin, methicillin and cloxacillin. Antoine v. Leeuwenhoek 31, 383-385 (1965)
25. INGHAM, H.R., SELKON, J.B., CODD, A.A., HALE, J.H.: The effect of carbon dioxide on the sensitivity of Bacteroides fragilis to certain antibiotics in vitro. J. Clin. Path. 23, 254-258 (1970)
26. KEUSCH, G.T., O'CONNELL, C.J.: The susceptibility of Bacteroides to the penicillins and cephalothin. Amer. J. Med. Sci. 251, 428-432 (1966)
27. KISLAK, J.W.: The susceptibility of Bacteroides fragilis to 24 antibiotics. J. infect. Dis. 125, 295-299 (1972)
28. LODENKÄMPER, H., STIENEN, G.: Importance and therapy of anaerobic infections. Antibiotic Med. 1, 653-660 (1955)
29. LODENKÄMPER, H., STIENEN, G.: Zur Therapie anaerober Infektionen. Dtsch. med. Wschr. 81, 1226-1231 (1956)
30. LOWELL-RANTZ, A.: Bacteroides endocarditis. Report of a case successfully treated with terramycin. J. Am. Med. Ass. 147, 124 (1951)
31. MARTIN, W.J., GARDNER, M., WASHINGTON,II, J.A.: In vitro antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens. Antimicrob. Agents Chemother. 1, 148-158 (1972)
32. MAUPEOU, E. de: Les septicémies à Ristella fragilis (à propos de 10 observations). Thèse, Montpellier (France) 1973

33. NACESCU, N., BRANDIS, H., WERNER, H.: Isolierung von 2 Bacteroides fragilis-Phagen aus Abwasser und Nachweis lysogener B. fragilis-Stämme. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 219, 522-529 (1972)
34. NASTRO, L.J., FINEGOLD, S.M.: Bactericidal activity of five antimicrobial agents against Bacteroides fragilis. J. infect. Dis. 126, 104-107 (1972)
35. PEARSON, H.E., ANDERSON, G.V.: Genital bacteroidal abscesses in women. Amer. J. Obstet. Gynec. 107, 1264-1265 (1970)
36. PINKUS, G., VETO, G., BRAUDE, A.J.: Bacteroides penicillinase. J. Bact. 96, 1437-1438 (1968)
37. PREVOT, A.R.: Études de systématique bactérienne III. Invalidité du genre Bacteroides Castellani et Chalmers. Démembrement et reclassification. Ann. Inst. Pasteur 60, 285-307 (1938)
38. REINHOLD, L.: Stoffwechselleistungen bei Stämmen des Genus Bacteroides. Zbl. Bact. I. Orig. 193,491-501 (1964)
39. REINHOLD, L.: Resistenzprüfungen an Stämmen des Genus Bacteroides und Sphaerophorus im Agardiffusionstest. Zschr. ges. Hyg. 11, 711-716 (1965)
40. SCHAFFNER, Y.: Les bacilles anaérobies non sporulés à Gram negatif favorisés par la bile. I-Etude bactériologique-leur appartenance au genre Eggerthella (nov. gen.). II-Pouvoir pathogène naturel à propos de 81 observations d'infection humaine. Thèse, Lille 1963
41. SCHOUTENS, E., LABBE, M., YOURASSOWSKY, E.: Septicémies à "Bacteroides fragilis". Incidence et sensibilité des souches aux antibiotiques. Path. Biol. (Paris) 21, 349-353 (1973)
42. STEVENS, W.C., HARRISON, A.P.: In vitro antibiotic sensitivities of Bacteroides and similar forms. Antibiotic and Chemotherapy 8, 192 (1958)
43. SUTTER, V.L., FINEGOLD, S.M.: Antibiotic disc susceptibility tests for rapid presumptive identification of gram-negative anaerobic bacilli. Appl. Microbiol. 21, 13-20 (1971)
44. SUTTER, V.L., KWOK, Y.Y., FINEGOLD, S.M.: Standardized antimicrobial disc susceptibility testing of anaerobic bacteria. I. Susceptibility of Bacteroides fragilis to tetracycline. Appl. Microbiol. 23, 268-275 (1972)
45. SUTTER, V.L., TALLY, F.P. KWOK, Y.Y., FINEGOLD, S.M.: Activity of doxycycline and tetracycline versus anaerobic bacteria. Clin. Med. 80, 31-38 (1973)
46. VÖMEL, W., SAUER, W.: Zur Frage einer antimikrobiellen Wirkung des neuen oralen Antidiabetikums HB 419. Arzneimitt. Forsch. 19, 1491-1494 (1969)
47. WALTER, A.M., HEILMEYER, L.: Antibiotika-Fibel, 3. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttg. 1965
48. WERNER, H.: Untersuchungen über die gramnegativen anaeroben sporenlosen Stäbchenbakterien des Menschen. Habilitationsschrift, Bonn 1966

49. WERNER, H.: Bacteroides convexus Eggerth und Gagnon 1933 identisch mit Bacteroides fragilis (Veillon und Zuber 1898) Castellani und Chalmers 1919. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 211, 344-353 (1969)
50. WERNER, H.: Das serologische Verhalten von Stämmen der Species Bacteroides convexus, B. thetaiotaomicron, B. vulgatus und B. distasonis. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 210, 192-201 (1966)
51. WERNER, H.: Glutaminsäuredecarboxylaseaktivität bei Bacteroides-Arten. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 215, 320-326 (1970)
52. WERNER, H.: The susceptibility of Bacteroides, Fusobacterium, Leptotrichia, and Sphaerophorus strains to rifampicin. Arzneimitt. Forsch. 22, 1043-1045 (1972)
53. WERNER, H.: Anaerobierdifferenzierung durch gaschromatographische Stoffwechselanalysen. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 220, 446-451 (1972)
54. WERNER, H.: Experimentelle Infektionen durch Bakteroidazeen. Handbuch d. exp. Pharmakol. Bd. XVI/11B, 185-229 (1973)
55. WERNER, H.: Anaerobic infections in Europe. In: "Anaerobes in Clinical Medicine", published by Igakushion, Tokyo, im Druck
56. WERNER, H.: Differentiation and medical importance of saccharolytic intestinal Bacteroides. Arzneimitt. Forsch. 24, 340-343 (1974)
57. WERNER, H., BÖHM, G.: Empfindlichkeit sporenloser Anaerobier der Gattungen Bacteroides, Fusobacterium, Sphaerophorus, Peptococcus und Peptostreptococcus gegen Clindamycin. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A 229, 401-408 (1974)
58. WERNER, H., NEUHAUS, F., REICHERTZ, C.: Otogener Hirnabszeß durch die darmbewohnende Bacteroides-Art B. fragilis. Dtsch. med. Wschr. 95, 343-345 (1970)
59. WERNER, H., PULVERER, G.: Häufigkeit und medizinische Bedeutung der eitererregenden Bacteroides- und Sphaerophorus-Arten. Dtsch. med. Wschr. 96, 1325-1329 (1971)
60. WERNER, H., REICHERTZ, C.: Buttersäurebildende Bacteroides-Kulturen. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 217, 206-216 (1971)
61. WERNER, H., REICHERTZ, C., SCHRÖTER, G.: Der Bacteroides-Anteil der menschlichen Darmflora. Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. 212, 530-537 (1970)
62. WERNER, H., RINTELEN, G.: Untersuchungen über die Konstanz der Kohlenhydrat-Spaltung bei intestinalen Bacteroides (Eggerthella)-Arten. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 208, 521 - 528 (1968)
63. WERNER, H., SEBALD, M.: Etude sérologique des anaérobies Gram négatifs asporulés et particulièrement de Bacteroides convexus et Bacteroides melaninogenicus. Ann. Inst. Pasteur 115, 350-366 (1968)

64. ZABRANSKY, R.J., JOHNSTON, J.A., HAUSER, K.J.: Bacteriostatic and bactericidal activities of various antibiotics against Bacteroides fragilis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 3, 152-156 (1973)
65. ZECHNER, E.: Erfahrungen mit einer standardisierten Methode der Resistenzbestimmung von Bakterien. Ärztl. Labor 19, 145-150 (1973)

Herrn Prof. Dr. H. Werner möchte ich für die Überlassung des Themas, für die stete Hilfe während des experimentellen Teiles der Arbeit sowie für die Beratung bei der Abfassung des Manuskriptes herzlich danken.

LEBENSLAUF

Als Sohn des Dr. med. Paul Spengruber und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Koch, wurde ich am 22. Mai 1947 in Velden/Vils geboren.

Von 1953 - 1958 besuchte ich die Volksschule in München. 1958 wurde ich in das Wittelsbacher Gymnasium aufgenommen. 1964 wechselte ich auf das Nymphenburger Gymnasium über, in dem ich 1969 das Abitur ablegte.

Vom Wintersemester 1969/70 an studierte ich in Köln Medizin; im Sommer 1972 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Die nächsten 3 Semester studierte ich in Bonn, Wien und wiederum in Bonn. Mit dem 4. klinischen Semester kehrte ich nach Köln zurück, wo ich im Herbst 1975 die ärztliche Prüfung bestand.

Herstellung: Druck und Verlag Ing. H. O. Hövelborn 5216 Niederkassel-Mondorf, Provinzialstraße 25
Telefon Bonn 46 27 13
Archiv-Nr.: 127406